

(51) Int.Cl.⁹

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁)

(21) 出願番号 特願平9-502399
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996) 6月13日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 12月15日
 (86) 国際出願番号 P C T / A T 9 6 / 0 0 1 0 6
 (87) 国際公開番号 W O 9 7 / 0 0 3 3 0
 (87) 国際公開日 平成9年(1997) 1月3日
 (31) 優先権主張番号 A 1 0 0 7 / 9 5
 (32) 優先日 1995年6月13日
 (33) 優先権主張国 オーストリア (A T)

(71) 出願人 ヒムラー, ゴットフリート
 オーストリア国、アー-1180 ウィーン、
 コロレドガッセ 29/13
 (71) 出願人 シュレーデラー, トーマス
 オーストリア国、アー-1220 ウィーン、
 ドラゴナーヴェーク 21
 (72) 発明者 ヒムラー, ゴットフリート
 オーストリア国、アー-1180 ウィーン、
 コロレドガッセ 29/13
 (72) 発明者 シュレーデラー, トーマス
 オーストリア国、アー-1220 ウィーン、
 ドラゴナーヴェーク 21
 (74) 代理人 弁理士 津国 肇 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の無転写増幅方法

(57) 【要約】

本発明は、核酸または配列を、増幅の前に少なくとも部分的にそれらの独立した鎖に分け、および/または転写し、反応混合物が、増幅される核酸または配列の末端の塩基配列に対して本質的に相補的である塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含み、前記オリゴヌクレオチドが、特定の条件において、核酸合成のための出発点および/または化学ビルディングブロックを形成することができ、形成される増幅生成物に組込まれる、酵素による核酸または核酸配列の無転写増幅方法に関する。ビルディングブロックからの生成物そのものが再び、増幅される核酸または配列に対応する。オリゴヌクレオチドビルディングブロック、おそらくは鋳型または他の化学ビルディングブロックから形成された反応生成物が、オリゴヌクレオチドビルディングブロックと再び一工程で反応し、この反応が実質的に等温で実施される。

図1

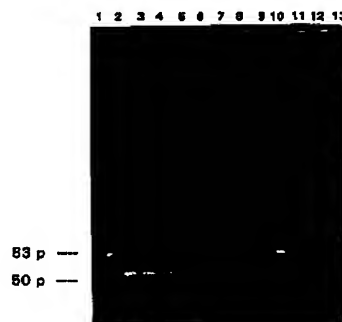


図1 HIV-1 配列を有するRNAを逆転写したのち、等温増幅することによって得られたDNA断片のアガロース電気泳動図
 レーン1および10: 50および83塩基長の基準断片
 レーン2、3、4、5、6、7、8: HIV-1配列を有するRNA
 1 fmol, 100 nmol, 10 nmol, 1 nmol, 0.1 nmol, 0.01 nmolおよび0.001 nmolの検出
 レーン9および11: RNAなしの水の空白対照
 レーン12: 逆転写酵素なしの等温増幅の空白対照
 レーン13: 逆転写酵素なし、かつTaq DNAポリメラーゼなしの空白対照

【特許請求の範囲】

1. 核酸または核酸配列を、場合によっては、増幅の前に少なくとも部分的に1本ずつの鎖に分け、および／または転写し、反応配合物が、増幅させる核酸または核酸配列の末端の塩基配列に対して実質的に相補的である塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含み、前記オリゴヌクレオチドが、適当な条件下、核酸合成のための出発点および／または化学ビルディングブロックを形成してもよく、形成させる増幅生成物に組込まれ、これらのビルディングブロックからの生成物そのものが、増幅させる核酸または核酸配列に対応する、酵素による核酸または核酸配列の無転写増幅方法において、オリゴヌクレオチドビルディングブロック、場合によっては鋳型および場合によってはさらなる化学ビルディングブロックによって構成された反応生成物が、オリゴヌクレオチドビルディングブロックと再び一工程で反応し、この反応が実質的に等温で実施されることを特徴とする方法。
2. 増幅に使用される酵素がポリメラーゼである、請求項1記載の方法。
3. 増幅に使用されるポリメラーゼが鎖置換（displacement）活性を示す、請求項2記載の方法。
4. 増幅に使用されるポリメラーゼが逆転写酵素活性をも示す、請求項2または3記載の方法。
5. ポリメラーゼに加え、リガーゼを酵素として増幅に使用する、請求項2～4のいずれか1項記載の方法。
6. 増幅に使用される酵素がリガーゼである、請求項1記載の方法。
7. 使用されるオリゴヌクレオチドの少なくとも1個を、適当な担体、例えばプラスチック面に固定する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。
8. 使用されるオリゴヌクレオチドの鎖解開始温度よりも高い温度で増幅を実施する、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。
9. オリゴヌクレオチドをできるだけ鋳型に近づける、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

10. ヘルパーオリゴヌクレオチドを増幅の改善に使用する、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

11. オリゴヌクレオチド配列が鋳型配列の少なくとも一部に正確に相補的である、請求項1～10のいずれか1項記載の方法。

12. 人間または動物の体の外での診断方法に用いるための、請求項1～11のいずれか1項記載の方法の用途。

13. オリゴヌクレオチドと目的産物との間の鎖解開始温度の差が25℃を超えず、好ましくは20℃を超えず、特に好ましくは15℃を超えない、請求項1～11のいずれか1項記載の方法に使用するための、オリゴヌクレオチドを含有する試薬キット。

14. オリゴヌクレオチドと目的産物との間の鎖解開始温度の差が10℃を超えず、好ましくは5℃を超えない、請求項13記載の試薬キット。

15. 核酸の様々な増幅方法における増幅工程としての請求項1～11のいずれか1項記載の方法の用途。

【発明の詳細な説明】

核酸の無転写増幅方法

[発明の分野]

本発明は、分子生物学および組換えDNA技術（遺伝子工学）の分野に関する。本発明は、核酸の簡素化されたin vitro合成を可能にする。本明細書に記載の方法は、プライマー依存性のDNA/RNAポリメラーゼ、DNA-およびRNA-リガーゼによる核酸の増幅に特に適用できる。本発明は、分子生物学、医学的診断、環境および法廷のための分析に無数の用途を有する。

本発明は、それによって核酸および核酸配列が、それぞれ、一本鎖へと少なくとも部分的に分離され、および／または転写される可能性がある、酵素を用いた、核酸および核酸配列それぞれの、等温の、転写に基づかない増幅方法に特に関する。

増幅は、増幅しようとする核酸または核酸配列の相補的な鎖の末端の配列に基本的に相補的な配列を有する、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドビルディングブロックを酵素的に組込むことによって進行し、その際、ビルディングブロックの生成物自体が、増幅しようとする核酸および核酸配列に相当する。

[技術の現状]

核酸、例えばDNAおよびRNA、ならびに核酸配列のin vitro増幅は、それぞれ、多くの用途があり、また、様々な方法で実施され得る（本明細書での増幅とは、実質的な増幅、すなわち、出発材料の倍増を上回るそれを意味する）。

ポリメラーゼ活性によるDNAの増幅の原理は、Kleppe et al., J.Mol. Biol. 56:341 (1971)に詳細に記載されている。それによれば、酵素

によるDNA合成の出発点としてオリゴヌクレオチドを用いるため、この合成の生成物は、さらに合成するための鋳型として用い得る。この原理によれば、相補的核酸鎖を、合成の一つ一つの段階の間に反復的に分離しなければならない。米国特許第4,683,202号明細書は、この原理の具体化を記載している。適用される温度については、特に二つの方法を区別し得る：温度変化を、増幅温度と変性（鎖の分離）温度との間でサイクルさせることによる方法であって、その際、核酸

または核酸配列は、増幅段階の前に、一本鎖へと基本的に完全に分離しなければならない。他方の増幅方法は、等温で働く。

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、第一の群の温度サイクル法に属し、ここでは、温度を周期的変化に付すような反応で、核酸配列を指数関数的に増幅することができる。そのような増幅には、通常、熱安定性ポリメラーゼが用いられる [例えば、それぞれ、Saiki et al., Science 230:1350-1354 (1985) ; Saiki et al., Science 239:487(1988)] 。

米国特許第4,683,195 号明細書[Mullis et al.]によれば、温度サイクル法では、適切ないかなる変性の方法によっても、増幅段階に続いて鎖分離を実施することができ、該方法は、化学的、物理的、または酵素的であってよい。参照された文書では、物理的な鎖分離の方法が好適とされ、例えば、完全な変性（>99%）、すなわち2本の一本鎖に分離されるまで、核酸を加熱する。代表的な熱変性は、90～105℃の温度で実施され、一般に、0.5～3分間持続する。好適な温度は、0.5～3分間の90～100℃である。熱不安定性酵素を用いるときは（米国特許第4,683,202 号明細書）、熱による鎖分離のそれぞれの後で、新しい酵素を加えなければならない。熱安定性酵素を用いることによって、酵素添加

のために温度サイクルを中断することが不要になる。この方法は、温度サイクル装置によって「同時に」実施される。

温度サイクル法の群のもう一つの方法は、例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88:189-193 (1991)でのF. Barany による、いわゆるリガーゼ連鎖反応（LCR）であって、この方法は、PCRにおけるように、出発核酸の非線形増幅へと導き、やはり、周期的な温度変化が増幅温度と変性温度との間で進行し、熱安定性リガーゼを酵素として用いる（国際公開特許第90/01069号公報およびヨーロッパ公開特許第320308号公報）。LCRの特別な形態が、「間隙充填LCR」であって、この方法では、リガーゼに加え、ポリメラーゼを用いる。そのような反応では、ポリメラーゼ反応の生成物だけをリガーゼの基質として用いる（米国特許第5,427,930）。

僅かに異なる特性を有するいくつかの類似の酵素を一つの反応に用いて、ただ1種類の酵素だけでは達成できない特別な結果を達成してもよい。長いDNAの延長の増幅は、そのような反応の例である [W.M. Barnes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:2216-2220 (1994)]。

一方、等温法、例えば自己持続連続反応 (self sustained sequencing reaction) (3SR) のようなそれは、従来から周知である [例えば、E. Fahy et al., PCR Meth. Appl. 1:25-33 (1991); D. Kwok et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-7 (1989); 国際公開特許第88/10315号公報 (T.R. Gingeras ら) ; ヨーロッパ公開特許第0 329 822 号公報 (H.I. Miller ら) ; および J. van Brunt, Bio/Technology 8:291-4 (1990); 米国特許第5,409,818 号、第5,399,491 号および第5,194,370 号明細書]。

これらの方法は、共通して、等温で実施できるが、増幅段階が転写 (それぞれ、RNAからDNAへ、およびDNAからRNAへ) を介して実施

されるため、異なるいくつかの酵素 (例えば、逆転写酵素、RNAアーゼH、RNAポリメラーゼ) を増幅に必要とする。もう一つの短所は、使用される熱安定性酵素がないため、やはり、従来の等温法は、また、低い特異性を有する。RNA生成物が結果物である場合には、もう一つの短所は、操作がより困難である (サイズ分別は、DNAについてののように簡単ではない) ことである。利用できる汚染制御システムもない。

下記の参考文献は、それぞれ特定の酵素系 (制限エンドヌクレアーゼ、Q β レプリカーゼ) を用いる、核酸および核酸配列の増幅のさらなる代替的な方法を記載している: G.T. Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392-6 (1992); 米国特許第5,356,774 号明細書 (V.D. Axelrodら) ; および P. Knight, Bio/Technology 7:609-10 (1989)。

国際公開特許第90/10064号公報および第91/03573号公報は、核酸の等温増幅に ϕ 29ファージの複製起点を用いることを記載している。

いわゆる鎖置換増幅 (米国特許第5,455,166 号明細書および第5,422,252 号明細書) は、相補的核酸の鎖の一方の置換を一定の領域 (反応混合物中のプライマ

ーおよび特定のエンドヌクレアーゼによって規定される)で開始するが、同時に、新たな相補鎖を合成する、ポリメラーゼの鎖置換活性に基づく。

簡単な等温鎖置換増幅法が、ヨーロッパ公開特許第0 676 476 号公報に記載されている。この方法では、ポリメラーゼである1種類の酵素のみを要するにすぎない。しかし、増幅には、1鎖あたり少なくとも2種類のオリゴヌクレオチド、すなわち全部で4種類のオリゴヌクレオチドを必要とする。

P C Rの特別な形態は、nested P C Rである(例えば米国特許第5,340,728号明細書、ヨーロッパ公開特許第0 519 338 号公報、米国特

許第4,683,195 号明細書、同第5,314,809 号明細書)。

P C Rのもう一つの特別な形態は、R T-P C Rであって、R N Aの鋳型を最初にc D N Aへと転写する。逆転写酵素活性はもとより、D N Aポリメラーゼ活性を示す酵素も用いることができる(例えば米国特許第5,322,770 号明細書)。

これらの方法は、すべて、研究にそれらの適所があるが(P C Rは、最新の分子生物学研究室になくてはならない)、複雑であり、要求が非常に過酷であるため、定型的方法として記載されることは殆どない。また、これらの方法には、装置や試薬の高い費用が付きものであるが、それは、特に温度サイクルには、高価な高性能サーモスタットが必要であり[R. Hoelzel, "Trends in Genetics" 6:2 37-238 (1990);またはU. Linz, Biotechniques 9:286-292 (1990)を参照されたい]、一方、等温法には、高価な酵素を用いなければならないからである。

定義:

等温(的): 「実質的に等温(的)」および「基本的に同じ温度」とは、商業的サーモスタットの逸脱の範囲での、与えられた温度からの逸脱を意味する。

出発材料: 本発明による方法では、精製または未精製形態での核酸または核酸配列は、すべて、用いるオリゴヌクレオチドビルディングブロックに特異的である核酸配列を基本的に含む(または含むと想定される)ならば、出発材料として用いてよい。本発明による方法には、一本鎖または二本鎖形態でのD N AもしくはR N A(m R N A、r R N A、t R N Aなどを包含する)を用いてよい。その上、D N A-R N Aハイブリッドを鋳型として用いてもよい。これらの核酸種の

混合物も、以前の増幅から得られる核酸と同じく用いてよい。そうして、以前の増幅におけると同じで

あるか、または異なるオリゴヌクレオチドを用いて、それを増幅してよい。

増幅しようとする特異的な核酸または核酸配列は、より大きい分子の一部であっても、または、分子が核酸全体の特異的配列に相当するようなものであってもよい。

増幅しようとする配列が純粋な形態であることは、必要でなく、複合した混合物の破片（例えばゲノムの一部）であってもよい。このゲノム自体も、生物学的サンプル（例えば細胞または組織）の部分にすぎなくてもよい。

出発核酸または核酸配列は、それぞれ、一つ以上の特定の核酸配列（同一であっても、異なってもよい）を含んでよい。したがって、増幅の方法は、大量の特定の核酸を製造するのに適するばかりでなく、出発核酸または核酸配列のいくつかの下位配列を、一つの反応容器中で同時に増幅するのに用いてもよい。

増幅反応の前に一本鎖に分離されて（変性されて）いてよい核酸は、異なる入手源、例えばpBR322のようなプラスミド、クローニングしたDNAまたはRNA、化学的に合成したDNAまたはRNA、あらゆる起源（例えば、細菌、酵母、真菌、ウイルスおよび細胞小器官；または植物、動物もしくはヒトのような高等生物）の天然のDNAまたはRNAから得てよい。DNAまたはRNAは、例えば血液、体液、植物の液汁、培地または組織から、多数の手法によって抽出してよい〔例えば、“Molecular Cloning. A Laboratory Manual”, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York (1988)を参照されたい〕。組織または細胞の非抽出部分を用いてもよい。原則として、本発明による方法を用いて、いかなる特定の核酸を増幅してもよい。

化学ビルディングブロック：本文書中では、用語「化学ビルディングブロック」は、核酸の酵素的合成に用いられるか、または用いてよいようなもの、例えばデオキシリボヌクレオチド三リン酸、リボヌクレオチド三リン酸、オリゴヌクレオチド（例えば、リボオリゴヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド）を

意味する。修飾されたビルディングブロック、例えば、ビオチンなどのような一定のマーカー、またはリン酸基のような反応性の基を有するブロックを用いてもよい。例えば、ヌクレオチドやヌクレオシド、およびそれらの誘導体の一部のような、より小さいビルディングブロックを用いてもよいと考えられる。

オリゴヌクレオチドビルディングブロック：用語「オリゴヌクレオチド」は、本明細書では、少なくとも2個のデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはそれらの誘導体を含む、天然に産するか、または合成による分子について用いられる。塩基内、またはオリゴヌクレオチドのバックボーン内に修飾があってもよい（例えば、ペプチド核酸、ヘキサースリン酸など）。

オリゴヌクレオチドの実際の大きさは、いくつかの要因に依存するが、該要因は、また、オリゴヌクレオチドのそれぞれの用途または機能に依存する。オリゴヌクレオチドは、化学的に合成しても、DNA—またはRNA—配列の調製またはクローニングによって生産してもよい。

オリゴヌクレオチドビルディングブロックは、化学ビルディングブロックとして本発明で用いられるオリゴヌクレオチドである。したがって、オリゴヌクレオチドビルディングブロックは、核酸、核酸配列またはオリゴヌクレオチドであって、適当な条件下（すなわち、酵素の影響、例えばさらなるオリゴヌクレオチドビルディングブロックのような、必要な化学ビルディングブロックの存在、ヌクレオチド三リン酸、緩衝条件、例えば

pH、イオン強度、補因子など）、および適切な温度で、核酸の合成のための化学ビルディングブロックとして役立ち得る。

オリゴヌクレオチドビルディングブロックと鋳型との間の相補的塩基配列の数に関しては、特定の核酸配列の両端の、増幅するのに十分な数の塩基が基本的に知られていることが必要なだけであるため、少なくとも二つのオリゴヌクレオチドビルディングブロックを合成し得るが、うち少なくとも一つは、それぞれの相補的鎖とハイブリダイズさせてよい。配列上の相対的位置は、一つのオリゴヌクレオチドビルディングブロックによって（ポリメラーゼで触媒される増幅で）か、または二つのオリゴヌクレオチドビルディングブロックによって（リガーゼを

介して触媒される反応で) 形成される生成物が、鑄型として、それぞれの他方のオリゴヌクレオチドビルディングブロックの酵素による伸長にか、またはそれぞれの他のオリゴヌクレオチドビルディングブロックのための結合(リガーゼで触媒される反応で) に役立ち得るように、好むままに選ばれる。

オリゴヌクレオチドビルディングブロックは、天然の供給源、例えば制限消化されたDNAに由来するか、あるいは、化学的に合成し、および/または酵素によって生成してよい。オリゴヌクレオチドビルディングブロックの厳密な長さは、いくつかの要因、例えば温度、鑄型配列などに依存する。オリゴヌクレオチドビルディングブロックは、一般的には15~40塩基の長さを有するが、より短くても、より長くてもよい。概して、より短いオリゴヌクレオチドビルディングブロックは、効率的な反応のためには、より低い温度を要する。いずれにしても、本発明による方法に用いられるオリゴヌクレオチドビルディングブロックは、増幅しようとするそれぞれの特異的配列に実質的に相補的でなければならない。

オリゴヌクレオチドビルディングブロックは、そのそれぞれの鑄型鎖に

厳密に相補的である必要はない。例えば、反応すべきオリゴヌクレオチドビルディングブロックの外側末端に、非相補的ヌクレオチド配列および/またはマーカ―(例えばハプテンもしくは酵素)を付加することが可能である。

転写：転写は、DNA鎖を鑄型として用いることによって、RNA鎖を構成する過程である。転写の特別な場合は逆転写であって、ここでは、RNA鎖を鑄型として用いて、DNA鎖が生成(構成)される。本説明での「転写」は、一核酸種(RNAまたはDNA)からそれぞれの他の核酸種(DNAまたはRNA)へと導く過程を意味する。

鑄型：それぞれの相補鎖の合成のための基盤として役立ち得るあらゆる核酸または核酸配列を、「鑄型」という。出発核酸ばかりでなく、中間体および反応生成物も鑄型になり得る。

(突然) 変異：(突然) 変異は、核酸の塩基の内容の変化である。存在する塩基は天然の塩基であってよく、相違は、塩基の欠失、交換または付加であってよい。その上、核酸の塩基組成は、実質的に同じであってよく、変化は、分子の化

学的修飾に関連してよい。上記の形式の組合せであってもよい。

酵素：酵素は、通常は、化学反応を触媒するポリペプチドであるが、酵素として用い得るその他の分類群の化合物（例えばRNA、合成重合体）に酵素活性を見出すことが可能である。「酵素」は、類似の特性を有する異なる酵素の混合物を含むとも理解される。

ヘルパーオリゴヌクレオチド：ヘルパーオリゴヌクレオチドは、化学反応を改善するが、そのような反応に化学ビルディングブロックとしては用いられない、オリゴヌクレオチドである。

反応生成物：反応生成物は、酵素活性によって付加された化学ビルディ

ングブロックから生成された、核酸の二本鎖分子である。反応生成物は、部分的に鋳型よりなってもよい。

[発明の要約]

本発明は、増幅の前に、必要ならば、核酸または核酸配列を、それぞれ、一本鎖へと少なくとも部分的に分離し、および／または転写し、反応混合物が、増幅しようとする核酸または核酸配列の末端の塩基配列に実質的に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含有し、該オリゴヌクレオチドが、適切な条件下で、核酸合成のための出発点および／または化学ビルディングブロックを形成してよく、かつ形成しようとする増幅生成物へと構成され、その際、これらのビルディングブロックからの生成物自体が、増幅しようとする核酸または核酸配列に相当する、酵素を用いる核酸または核酸配列の、それぞれ転写を含まない増幅の方法であって、場合により鋳型を用い、かつ場合によりさらなる化学ビルディングブロックを用いて、オリゴヌクレオチドビルディングブロックによって形成した反応生成物を、再びオリゴヌクレオチドビルディングブロックと一段階で反応させ、該反応を実質的に等温で実施することを特徴とする、増幅の方法に関する。

[発明の詳細な説明]

PCR、LCRまたは3SRのような慣用の方法の公知の短所を克服すること、および簡単で費用効果的な、上記の種類の方法を提供することが本発明の目的

である。

この任務は、本発明に従って、実質的に等温の方法を実施すること、およびただ1種類のみの酵素を用いることによって、解決される。

そのような等温法では、増幅は進行するが、核酸または核酸断片は、二本鎖のままである、すなわち増幅しようとする相補的な核酸の塩基対間

の水素結合は、殆ど完全なままである。言い換えれば、このことは、増幅の間、相補的な核酸および核酸断片は、それぞれ二本鎖として存在することを意味する。

すべての反応物、ヌクレオチド三リン酸、オリゴヌクレオチドビルディングブロック、生成物、鋳型および酵素は、相互に、および他のすべての反応化合物に関して定常状態の平衡にある。反応条件、および特に反応温度は、本発明によれば、増幅生成物も好ましくは二本鎖であるように選ばれる。反応機序は未だ明らかではないが、入手できるデータ、および実験の結果によれば、本発明による方法では、オリゴヌクレオチドビルディングブロックは、それぞれ二本鎖形態の出発核酸および核酸断片に既に加えられていると考えられるが、これは、そのような機序に関する従来からの見解と矛盾する。そのため、核酸もしくは核酸断片の、または、反応が進行するならば、反応の中間生成物の、PCR、LCR、3SRなどのような慣用の方法に不可欠である、一本鎖への強制的分離は不要である。

通常の方法は、反応中間生成物のそれらの一本鎖への分離に、次いで、これらの一本鎖とのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づく。しかし、本発明による方法は、オリゴヌクレオチドが、与えられた温度で出発材料および増幅生成物と、それぞれ一段階で反応し、酵素による接触作用の結果、増幅生成物がこれらの反応生成物から再び生じるという意外な観察に基づく。最新の方法との基本的かつ重要な相違は、PCRまたはLCR、および関連する方法では、熱変性によって一本鎖が調製されて、オリゴヌクレオチドに一本鎖の鋳型を与え、次いで、それにプライマーおよびオリゴヌクレオチドビルディングブロックがハイブリダイズするということである。

しかし、本発明の方法では、動的平衡が存在するときは、反応成分を過

剰に加えるならば、反応生成物を優位にすることができるという事実を活用する。この種の反応は、鎖侵入（または鎖交換(exchange)）と呼ばれ、本発明の先順位出願の出願日以後に、D型DNAについて記載されている[M. Iyer et al., J. Biol. Chem. 270:14712 (1995)]。しかしながら、鎖侵入は、DNAの最も一般的な形態であるB型のDNAでは観察できなかった。本発明では、B型の核酸らせんを熱によって不安定化するため、意外にも、鎖交換反応を生じ易くなる。鎖交換反応を改善するペプチドも、記載されている[D.R. Corey, J. Am. Chem. Soc., 9373(1995)]。本発明では、そのようなペプチド配列も用い得る。鎖交換反応を改善するために、ペプチド核酸を用い得ると考えられる[M. Iyer et al., J. Biol. Chem. 270:14712 (1995)]。

したがって、一本鎖ではない分子が鋳型として提示される、本発明による方法では、オリゴヌクレオチドビルディングブロックは、そのような等温反応においてそれ自体で二本鎖の増幅生成物と反応して、新たな不完全な反応物を与え、次いで、それが、直ちに、それぞれの酵素、および他のすべての反応相手と自触媒作用によって反応して、新たな増幅生成物を与える。

本発明による方法のために、異なる酵素を単独でか、または組合せて用いてよい。ポリメラーゼを用いるならば、合成は、オリゴヌクレオチドビルディングブロックの3'末端で始まり、鋳型沿いに5'末端へ方向に進行する。プライマーの5'末端で合成を開始し、3'末端へ方向に進める酵素が存在できると思われる。そのような酵素も、本発明による方法に用い得られると思われる。オリゴヌクレオチドビルディングブロック依存性RNAポリメラーゼを酵素として用いることも企図できると思われる。リガーゼを用いるならば、概して部分的には、末端にリン酸基を有するオリ

ゴヌクレオチドビルディングブロックを用いる。特定の増幅を得るために、類似の酵素の混合物、または異質の酵素の混合物を一反応に用い得ることも考えられる（例えば、2種類またはそれ以上の異なるポリメラーゼ、もしくはポリメラー

ゼトリガーゼ)。特定の核酸または核酸配列は、この特定の配列（またはその一部）を鋳型として含む、核酸含有サンプルを用いることによって生成する。ポリメラーゼを用いる場合に、生成しようとする核酸または核酸配列がDNAであるならば、用いて好ましい4種類のヌクレオチド三リン酸は、dATP、dCTP、dGTPおよびTTPである。

反応に必要なオリゴヌクレオチド濃度は、変動幅があり得るが、通常、（モル比で表して）鋳型の濃度より高い。大幅なモルの過剰は、通常、反応を改善する。

場合により、本発明による方法の最初の段階は、核酸の変性（鎖分離）または転写であってよく、その結果、反応温度へのその後の冷却の際に、鋳型鎖、オリゴヌクレオチドビルディングブロック、場合によりヌクレオチド三リン酸と、それぞれの酵素、好ましくはポリメラーゼおよびリガーゼとの広範囲の接触が可能である。未だ反応液中にないならば、選んだ酵素、および必要とされる化学ビルディングブロックを反応混合物に加え、次いで、適切な反応温度にする。反応条件、特に反応温度は、増幅生成物と化学ビルディングブロックとの間の動的平衡の利点を生かすことによって、鎖分離なしの増幅が可能になるように選ぶ。用いられるオリゴヌクレオチドは、それらの相補的結合部位に向って、二本鎖形態の増幅生成物中に直接ハイブリダイズし、こうして二本鎖形態の増幅生成物をジッパーのように開くと考えられる。

特異性のため、通常は、オリゴヌクレオチドビルディングブロックの計

算上の鎖解開始温度(Schmelztemperatur)より高い、特定の反応温度を選ぶ。

オリゴヌクレオチドビルディングブロックの鎖解開始温度は、異なる方法で算出してよいが、最適の増幅温度は、他の多くの要因（例えば、緩衝液のイオン強度、オリゴヌクレオチドビルディングブロックの濃度、鋳型の長さおよび塩基組成など）に依存する。

オリゴヌクレオチドビルディングブロックを、鋳型上で互いにできるだけ近くに位置させる結果、好ましくは、増幅生成物が、用いたオリゴヌクレオチドの長さの合計と、同じ大きさを有すること、すなわちそれより実質的に大きくはなら

ないことが、好都合である。

本発明によれば、本発明の方法に用いるためのオリゴヌクレオチドビルディングブロックを含有する試薬キットも提供されるが、オリゴヌクレオチドビルディングブロックと、期待される生成物との鎖解開始温度の差は、25℃以下、好ましくは20℃以下、より好ましくは15℃以下である。

オリゴヌクレオチドビルディングブロックと、期待される生成物との鎖解開始温度の差が10℃以下、好ましくは5℃以下であるならば、特に好ましい。

診断の方法のためには、オリゴヌクレオチドビルディングブロックの塩基配列が、標的配列の少なくとも一部に厳密に相補的であるならば、最良である。

本発明による方法の利点は、特に、温度サイクルの必要がないため、高価な機器類の必要がなく、標準化するのが容易であり、より大量の反応（1mlまたはそれ以上）を実施することができ、そして最後に、僅か1種類の酵素が必要であるにすぎないということにある。本発明による方法

は、当然、PCRおよびLCRのような慣用の方法はもとより、関連する方法の際にも用いてよい。そうして、増幅段階の温度は、用いるオリゴヌクレオチドの計算上の鎖解開始温度より高いのが好ましい。

本発明の多くの特別な形態、例えばnested状のそれ、すなわち、外部のプライマービルディングブロックによる最初の増幅があり、その後、増幅生成物の一部をさらに増幅することがあり得ると考えられる。一つの反応管内での逆転写による増幅の結合も、可能である。

増幅生成物の検出は、原則として、PCRにおけるのと同様に実施してよい。蛍光法は特に適すると思われるが、これは、標識した1または2種類のオリゴヌクレオチドビルディングブロックのエネルギー移動 [T. Foerster, Discuss. Faraday Soc., 27:7 (1959)] または蛍光分極に基づく。標識した化学ビルディングブロックを増幅の際に組込んでおき、この組込みを蛍光測定または発光測定によって検出する蛍光法を用いてもよいと考えられる。

ここで、本発明による方法を、いくつかの実施例を用いて説明することにするが、これらの実施例にのみ拘束されるわけではない。

実施例1：線状一本鎖DNAの増幅

本実施例は、一定の一本鎖DNA分子をin vitroで酵素によって増殖させるのが可能であることを示す。2本の相補的DNA鎖とハイブリダイズする2種類のオリゴヌクレオチドビルディングブロックを用いて、二本鎖生成物を形成する。増幅温度と変性温度との間の反応温度の一般的な反復的变化は皆無である。詳細に説明されない手法および方法はすべて、遺伝子工学または分子生物学の方法の収集書に記載されている、標準的手法である[例えば”Molecular Cloning. A Laboratory Manual”; Sambrook et al.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989); ISBN

0-87969-309-6]。

1. 1. 反応混合物：

反応混合物50 μ lを、それぞれ、ピペットで0.5ml反応管（Eppendorf, Safe-Lock）に移した。反応混合物は、下記の組成を有した：

10mMの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

20mMのトリスHCl（25℃でpH8.8）

2mMの MgSO_4

それぞれ200 μ MのTTP、dGTP、dATPおよびdCTP（PROMEGA, Wisc., 米国）

0.1w/v%のTriton X-100（SERVA, ドイツ国）

10pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロックu676：

5'-dgAgCCTTCAACCCAgTCAGCTCCTTCCggTgggCgCggggC-3'

10pmolオリゴヌクレオチドビルディングブロック1755：

5'-dCgCCgAAAAATgACCCAgAgCgCTgCCggCACCTgTCCTACgAgTTgCATg-3'

1fmol 鋳型-DNA：

5'-dgAgCCTTCAACCCAgTCAGCTCCTTCCggTgggCgCggggCCATgCAACTCg-TAggACAggTgCCggCgCgCTCTgggTCATTTTCggCg-3'

オリゴヌクレオチドおよびDNA鋳型は、CODON genetic system（Weiden/See、オーストリア国）より購入した。

鋳型DNAを加えない反応混合物を、負の対照として役立てた。

次いで、反応混合物に、鋳油 (Sigma、M-3516) 100 μ l を重ね、Perkin Elmer CetusのGeneAmp PCRシステム9600というサーモスタット上で84℃に加熱した。反応温度に達したとき、2単位の酵素Deep Vent[®] (exo⁻) というDNAポリメラーゼ (New England Biolabs、米国) を混合物に加えた。

次いで、増幅の速度論を確認するため、個々の試料および負の対照を84℃で異なる時間インキュベートした。それぞれ10 μ l の反応混合物を、2%アガロースゲル上で分析し、臭化エチジウムでの染色、およびUV蛍光分析によって可視化した。増幅生成物は、DNAの大きさの標準との比較によって、ただ1本の帯域として特定できた。

1. 2. 増幅の時間的経過：

この単一反応混合物の生成物を、電気泳動の後に定量した。定量は、単一反応混合物の連続希釈と、これらの希釈物の相互およびDNA標準との比較によって実施した。この分析の結果を表1に示す。

1. 3. 増幅生成物の分子クローニングおよび配列決定：

増幅の後、反応混合物をフェノール/クロロホルムおよびクロロホルムで抽出し、次いで、エタノールを用いてDNAを沈澱させた。乾燥したDNAを、1mMのATPと、10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ(Boehringer Mannheim)とを10 μ l の最終体積中に含有するリン酸化緩衝液(Boehringer Mannheim)中で37℃で1時間インキュベートした。次いで、滅菌蒸留水1.5 μ l、1MのMgCl₂ 1.5 μ l、1mMdNTP (それぞれ250 μ MのTTP、dGTP、dCTP、dATP) 1 μ l およびクレノウ酵素1 μ l (2単位) を混合物に加え、再び37℃で1時間インキュベートした。

反応混合物を、調製用アガロースゲルで分離し、DNAの帯域をゲルから精製し、連結反応に用いた。SmaIで消化し、脱リン酸化した生成物のプラスミドベクター (pBluescript IISK⁺, Stratagene) 内での連結反応を、標準的手法によって実施した。受容能を有する大腸菌MC1061という細菌での形質転換の後、細菌コロニーのいくつかを、配列決定のためのプラスミドDNAの調製用を選んだ。

。

M13 配列決定用およびM13 逆配列決定用プライマー (CODON 遺伝学システム) でクローニングした生成物の配列決定を、DyeDeoxy Termination法 (Applied Biosystems) に従って、配列決定装置ABI 373Aを用いて実施した。

増幅生成物の配列は下記のとおり読取れた：

5'-dgAgCCTTCAACCCAgTCAgCTCCTTCCggTgggCgCggggCCATgCAACTCgTAggACAggTgC
CggCagCgCTCTgggTCATTTTCggCg-3' (プラス鎖)

および

3'-dCTCggAAgTTgggTCagTCgAggAAggCCACCCgCgCCCCggTACgTTgAgCATCCTgTCCACg
gCCgTCgCgAgACCCAgTAAAgCCgC-5' (マイナス鎖)

こうして、増幅生成物は、2種類のオリゴヌクレオチドビルディングブロックによって規定される配列に厳密に対応することが示された。

表 1：反応生成物の増加の時間的経過

| 反応時間 (分) | 生成物の量 (pmol) |
|-------------|-----------------|
| 0 | 0.00 |
| 20 | 0.24 |
| 40 | 0.48 |
| 60 | 1.44 |
| 120 | 4.33 |
| 240 | 8.65 |

実施例 2：線状二本鎖DNAの増幅

本実施例は、特定の二本鎖DNA分子を、変性段階なしに酵素を用いてin vitroで増幅するのが可能であることを示す。

2本の相補的DNA鎖とハイブリダイズする2種類のオリゴヌクレオチドを用いて、増幅温度と変性温度との間の反応温度の通常の反復的变化を

避けつつ、二本鎖生成物を完全に形成する。

2. 1. 反応混合物:

反応混合物 50 μ l を、それぞれ、ピペットで 0.5 ml 反応管 (Eppendorf, Safe-Lock) に移した。反応混合物は、下記の組成を有した:

10 mM の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

20 mM の トリス HCl (25 $^{\circ}\text{C}$ で pH 8.8)

2 mM の MgSO_4

それぞれ 200 μM の TTP、dGTP、dATP および dCTP (PROMEGA, Wisc., 米国)

0.1 % (w/v) の Triton X-100 (SERVA, ドイツ国)

10 pmol の オリゴヌクレオチド 構成素材 u676:

(5'-dgAgCCTTCAACCCAgTCAGCTCCTTCCggTgggCgCggggC-3')

10 pmol オリゴヌクレオチド ビルディング ブロック 1755

(5'-dCgCCgAAAAATgACCCAgAgCgCTgCCggCACCTgTCCTACgAgTTgCATg-3')

1 fmol 鋳型-DNA:

5'-dgAgCCTTCAACCCAgTCAGCTCCTTCCggTgggCgCggggCCATgCAACTCgTAggACAggTgC
CggCgCgCTCTgggTCATTTTCggCg-3'

3'-dCTCggAAgTTgggTCAGTCgAggAAggCCACCCgCgCCCCggTACgTTgAgCATCCTgTCCACg
gCCgTCgCgAgACCCAgTAAAgCCgC-5'

鋳型 DNA を加えない反応混合物を、負の対照として役立てた。

次いで、反応混合物に、それぞれ、鋳油 (Sigma, M-3516) 100 μ l を重ね、Perkin Elmer Cetus の GeneAmp PCR システム 9600 サーモスタット上で 84 $^{\circ}\text{C}$ に加熱した。反応温度に達したとき、2 単位の 酵素 Deep Vent_R (exo) という DNA ポリメラーゼ (New

England Biolabs, 米国) を混合物に加えた。

次いで、試料および負の対照を 84 $^{\circ}\text{C}$ でさらに 14 時間 インキュベートした。

2. 2. 可視化

それぞれ 10 μ l の反応混合物を、2% アガロースゲル上で分析し、臭化エチジウムでの染色、および UV 蛍光分析によって可視化した。増幅生成物は、DN

Aの大きさの標準との比較によって、ただ1本の帯域として特定できた。

実施例3：二本鎖DNAの一部の増幅

本実施例は、増幅しようとするDNAは、より大きいDNA片の一部、特にプラスミドの一部であってよいことを示す。

制限エンドヌクレアーゼNarI(Boehringer Mannheim)を用いて線状化したプラスミドpUC19を、鋳型DNAとして役立てた。用いたオリゴヌクレオチドビルディングブロックは、下記のとおりであった：

M13rev(-48)(5'-dAgCggATAACAATTCACACAggA-3')および

M13iso(5'-dggCgTAATCATggTCATAgCTgTT-3')

反応混合物50μlを、ピペットで0.5ml反応管(Eppendorf, Safe-Lock)に移したが、反応混合物は、下記の内容を有した：

10mMの(NH₄)₂SO₄

20mMのトリスHCl(25℃でpH8.8)

2mMのMgSO₄

それぞれ200μMのTTP、dGTP、dATPおよびdCTP

0.1w/v%のTriton X-100

10pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロックM13rev(-48)

10pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロックM13iso

1ngの鋳型DNA。

負の対照のために、上記と同じであるが、鋳型DNAを省いた違いを有する混合物を、ピペットで計り取った。次いで、反応混合物を鉱油(Sigma、M-3516)100μlで覆った。反応混合物をサーモスタットで95℃に10分間加熱し(GeneAmp PCRシステム9600、Perkin Elmer Cetus)、70℃に冷却した後、2単位のDeep Vent_R(exo)DNAポリメラーゼ(New England Biolabs)を、各混合物に加えた。

次いで、試料および負の対照を70℃でさらに14時間インキュベートした。各混合物10μlを2%アガロースゲルで分離した。増幅生成物は、DNAの大

きさの標準との比較によって、単一帯域として特定することができ、臭化エチジウムによる染色、およびUV蛍光分析によって可視化した。

実施例4：ウイルス特異的cDNA配列の増幅によるRNAウイルスの検出

本実施例は、本発明による方法での鋳型として、cDNAを用い得ることを示す。特異的な固定化抗体を用いて、RNAウイルス（ブドウ扇状葉ウイルスgrapevine fanleaf virus、GFLV）を未精製植物抽出物から単離する。次いで、熱および洗剤処理によってウイルスRNAを遊離させ、特異的オリゴデオキシヌクレオチドを用いて逆転写させる。次いで、cDNAを等温で増幅する。

4. 1. 特異的血清による表面の被覆

GFLV血清（Bioreba, Basel、スイス国；0.1M炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6中に1:500に希釈）120μlを、プラスチックの

反応管（0.5ml；Multi-Technology, Salt Lake City、米国）にピペットで計り入れ、次いで、室温で1時間インキュベートした。次いで、TPBS（137mMNaCl、2.7mMKCl、10mMリン酸ナトリウム；0.1w/v%のTween 20；pH7.4）で管を3回洗浄した後、PBS（137mMNaCl、2.7mMKCl、10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.4）で2回洗浄した。

4. 2. プレコートした反応管内でのサンプルのインキュベート

ブドウの葉のサンプル（*Vitis vinifera* cv. French Colombard）を、GFLV-EELISA（Bioreba、スイス国）を用いて、GFLVによる感染について試験した。

プレコートした各管に、感染および非感染ブドウの葉の抽出物それぞれ100μlをピペットで計り入れ、4℃で2時間インキュベートした。次いで、TPBSで3回、およびPBSで2回、抗体を洗浄した。

4. 3. 用いたオリゴヌクレオチドビルディングブロック：

オリゴヌクレオチドビルディングブロックは、ブドウ扇状葉ウイルスの被覆タンパク質遺伝子の一部を増幅する。

”3'-BINE”：5'-dCTAgAgTgggAAACTggTTC-3'

(EMBL Accession Nr.X16907, 塩基 3543-3562)

"GFLV5'-ENIB":5'-dgTCCAggCTTTAgCTTTTATggTA-3'

(EMBL Accession Nr.X16907, 塩基 3519-3542)

4. 4. 逆転写:

各反応管に、RT緩衝液(50mMトリスHCl、pH8.3、7.5mMgCl₂)20μlを、追加の1mMdCTP、1mMdATP、1mMdGTP、1mMTTP、20pmolの「3'-BINE」オリゴヌクレオチドビルディングブロック、10単位のRNアーゼ阻害剤(Boehringer Mannheim、ドイツ国)、10単位の酵素であるAMV逆転写酵素

(Boehringer Mannheim、ドイツ国)、および0.5%Triton X-100とともにピペットで計り入れた。反応混合物を65℃で10分間、次いで42℃で10分間インキュベートした。

4. 5. 1. Deep Vent_R (exo⁻) DNAポリメラーゼによる等温DNA増幅

それぞれの反応混合物に、PCR緩衝液[10mM(NH₄)₂SO₄、20mMトリスHCl(25℃でpH8.8)、2mMgSO₄、0.1w/v%のTriton X-100]80μlを、追加の20pmolのオリゴヌクレオチド「3'-BINE」、20pmolのオリゴヌクレオチド「GFLV5'-ENIB」および4単位のDeep Vent_R (exo⁻) DNAポリメラーゼ(New England Biolabs)とともにピペットで計り入れた。反応混合物を軽質鉱油(Sigma)70μlで覆い、直ちに68℃に加熱し、この温度で16時間インキュベートする。

4. 5. 2. Taq DNAポリメラーゼによる等温DNA増幅

それぞれの反応混合物に、PCR緩衝液[10mMトリスHCl、50mMKCl、1.5mMgCl₂(20℃でpH8.3)]80μlを、追加の20pmolのオリゴヌクレオチド「3'-BINE」、20pmolのオリゴヌクレオチド「GFLV5'-ENIB」および5単位の酵素Taq DNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim)とともにピペットで計り入れた。反応混合物を軽質鉱油(Sigma)70μlで覆い、直ちに68℃に加熱し、この温度で16時間インキュベートする。

4. 6. 結果:

それぞれの反応混合物10μlを、電気泳動によって2%アガロースゲル上で

分離する。臭化エチジウムによる染色、および蛍光励起によって、反応生成物を可視化した。感染した植物材料を有するサンプルの場合、結

果は可視帯域であって、帯域の長さは、44塩基対に達した（DNA標準の「50塩基対ラダー」、USB, Ohio との比較による）。非感染植物からの植物抽出物を有するサンプルは、電気泳動で帯域を示さなかった。

実施例5：ゲノムDNAのgen領域の増幅

本実施例は、等温PCRによって、ゲノムDNAのgen領域を増幅するのが可能であることを示す。

5. 1. ゲノムDNAの調製：

細胞系A-498（ATCC、HTB44、ヒト腎臓癌腫）のDNAを標準的方法に従って調製した。この調製物を鋳型DNAとして用いた。

5. 2. オリゴヌクレオチドビルディングブロック：

appr:5'-dgCCTAATTCTCTCATAgTCTTAATTCAC-3'

appl-iso:5'-dAggTAggTAACTTgACTgCATgTTTCAA-3'

5. 3. 反応：

反応混合物100 μ lを0.5ml反応管（Eppendorf, Safe-Lock、ドイツ国）にピペットで計り入れたが、反応混合物は下記の組成を有した：

10mMの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

20mMのトリスHCl（25℃でpH8.8）

2mMのMgSO₄

それぞれ200 μ MのTTP、dGTP、dATPおよびdCTP

5 μ Mのビオチン-16-dUTP（Boehringer Mannheim）

0.1w/v%のTriton X-100

10pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロックappr

10pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロックappl-iso

5 μ gの鋳型DNA。

負の対照として、上記と同じ混合物であるが、鋳型DNAを省いた違いを有す

る混合物を、ピペットで計り取った。次いで、反応混合物を鉍油 (Sigma、M-3516) $100\ \mu\text{l}$ で覆った。次いで、混合物を 98°C で10分間加熱し、次いで 68°C まで冷却し、その後2単位の酵素Deep Vent_r (exo) DNAポリメラーゼ (New England Biolabs) を混合物のそれぞれに加えた。その後、サンプルおよび負の対照を 68°C で14時間さらにインキュベートした。

5. 4. 反応の解析：

次いで、各反応混合物 $90\ \mu\text{l}$ を、スロットブロット装置 (Hoefer Scientific; PR600 Slot Blot) を用いてニトロセルロース膜 (Hoefer Scientific Instruments, TM-NC2) 上にスポットし、その後、膜を真空オーブン中で 80°C に30分間加熱した。次いで、5w/v %の脱脂乳粉末 (Fixmilch mager、オーストリア国Maresiより) を加えたPBS中で、膜を室温で30分間インキュベートし、3回洗浄した。TPBSへのストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼ結合体 (Amersham、英国、1:1000希釈) とともに、室温で30分間さらにインキュベートした後、PBSでの5段階の洗浄を後続させた。次いで、0.1M炭酸ナトリウム緩衝液、pH9.6へのニトロブルー-テトラゾリウム (0.2mg/ml) および5-ブロモ-4-クロロ-3-インドキシル=ホスフェート (0.2mg/ml)、4mM MgCl_2 で展色した。30分の展色時間の後、ヒトゲノムDNAを含有する反応では、スポットに鮮明な青色を認めることができるが、負の対照は全く色を示さない。

反応混合物のそれ以上の分析は、多少の非特異的反応生成物を示したため、特異的増幅の量は、厳密に決定できなかった。

下記の反応条件下では、ゲノムDNAからの増幅をはるかに特異的に実

施することができた (反応混合物 $50\ \mu\text{l}$) :

20mMのトリスHCl (pH8.8)

5mMの MgSO_4

それぞれ $100\ \mu\text{M}$ のdNTP類

0.1w/v %のTriton X-100

10pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロック app r

10 ngの鋳型DNA

生成物は、電気泳動の後、単一帯域として明らかになる。

本実施例は、本発明による方法によって、点突然変異を検出するのが可能であることを示す。

"GFLV5'-ENIBmut": 5'-dgTCCAggCTTTAgCTTTTATggTC-3'

合成オリゴヌクレオチドを鋳型として役立てた。2種類のオリゴヌクレオチドは、第24位のただ1個の塩基が異なる：

BC: 5'-GTCCAGGCTTTAGCTTTTATGGTCGAACCAGTTTCCCACTCTAG-3'

反応混合物 50 μ l を、0.5ml 反応管 (Eppendorf, Safe-Lock) にピ

ペットで計り入れたが、反応混合物は下記の組成を有した：

10pmolのビルディングブロックGFLV5'-ENIB、または

10 pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロック GFLV5'-ENIBmut

約1 fmolの鋳型DNA (BAまたはBC)。

負の対照として、上記と同じであるが、鋳型DNAを省いた違いを有する反応混合物を、ピペットで計り取った。次いで、反応を鋳油 (Sigma、M-3516) 100 μ l で覆った。混合物を、サーモスタット (GeneAmp PCRシステム9600、Perkin Elmer Cetus) で95℃に10分間加熱し、次いで70℃に冷却し、2単位のDeep Vent[®] (exo) DNAポリメラーゼ (New England Biolabs) を加えた。

その後、試料および負の対照を68℃でさらに14時間インキュベートした。各混合物10 μ l を2%アガロースゲルで分離し、臭化エチジウムによる染色、およびUV蛍光分析によって可視化した。DNA長さ標準との比較によって、増幅生成物は、単一の帯域として特定することができた。結果を表2に要約する：

表2：

| オリゴヌクレオチドの組合せ | 鋳型BA | 鋳型BC |
|-----------------------|------|------|
| 3'BINE/GFLV5'-ENIB | + | - |
| 3'BINE/GFLV5'-ENIBmut | - | + |
| + . . . 電気泳動ゲルでの特異的帯域 | | |
| - . . . 電気泳動ゲルでの帯域は皆無 | | |

実施例7：線状一本鎖DNAの増幅

本実施例は、特定の一本鎖DNA分子の酵素によるin vitro増幅は、たとえその長さが、両オリゴヌクレオチド構成素材の長さの合計より大であっても、可能であることを示す。

ここでは、2本の相補鎖に結合する2種類のオリゴヌクレオチドビルディングブロックを用いて、反応温度を変えることなく、二本鎖分子を形成する。

7. 1. 反応混合物：

反応混合物50 μ l を、0.5 ml反応管 (Eppendorf, Safe-Lock) にピペットで計り入れたが、反応混合物は下記の組成を有した：

50 mMのKCl

10 mMのトリスHCl (20℃でpH8.3)

1. 5 mMのMgCl₂

それぞれ200 μMのTTP、dGTP、dATPおよびdCTP

10 pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロックu67。

(5'-dCAACCCAgTCAGCTCCTTCCggTgggCg-3')

10 pmolオリゴヌクレオチドビルディングブロック174

(5'-dCgCTgCCggCACCTgTCCTACgAgTTgCATgA-3')

1 fmol 鋳型-DNA:

5' CAACCCAgTCAGCTCCTTCCggTgggCgCggggCATgACTATCgTCgCCgCACTTATgACTg
TCTTCTTTATCATgCAACTCgTAggACAggTgCCggCagCg-3'

鋳型DNAの添加なしの反応混合物を、負の対照として役立てた。オ

リゴヌクレオチドビルディングブロックおよびDNA鋳型は、CODON genetic systemによって化学的に合成された。次いで、反応混合物を鉱油 (Sigma、M-3516) 100 μlで覆い、Perkin Elmer CetusのGeneAmp PCRシステム9600サーモスタットで84℃に加熱した。反応温度に達した後、5単位の酵素Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus) を混合物に加え、次いで、1種類の試料、および負の対照を、増幅の時間的経過を評価できるよう、84℃で様々な期間にわたってさらにインキュベートした。各混合物10 μlを2%アガロースゲルで分離し、臭化エチジウム染色およびUV蛍光分析によって可視化した。DNA標準との比較によって、増幅生成物を単一の帯域として特定することができた。

実施例8：鋳型依存性DNA連結反応による特定のDNA配列の検出

8. 1. オリゴヌクレオチドおよび鋳型：

すべてのオリゴヌクレオチドビルディングブロックおよび鋳型DNAは、CODON genetic systemより購入した。オリゴヌクレオチドAおよびDは、5'末端で化学的にリン酸化する。

オリゴヌクレオチド：

A: 5'-pdTTgTgCCACgCggTTgggAATgTA-3'

B: 5'-dAgCAACgACTgTTgCCCgCCAgTTg-3'

C: 5'-dTACATTCCCAACCGgTggCACAAC-3'

D: 5'-pdAACTggCgggCAAACAgTCgTTgCT-3'

鋳型DNA:

5'-dTACATTCCCAACCGgTggCACAACAACCTggCgggCAAACAgTCgTTgCT-3'

反応混合物:

20mM トリスHCl (pH7.5)、20mM KCl、10mM MgCl₂、1mM DTT

0.1% NP-40 (洗剤)、0.1mM の rATP

オリゴヌクレオチドA、B、C、D: 各1pmol

鋳型 (反応あたり100fmol)

鋳型DNAなしの負の対照。

反応混合物(19μl)を70℃に加熱し、次いで、4単位(1μl)のPfu DNA リガーゼ (Stratagene、米国) の添加によって、反応を開始した。反応を70℃で60分間実施した。インキュベート後、反応混合物を数分間、室温まで冷却させた。次いで、反応混合物それぞれ10μlを、ゲル電気泳動によって分析した (4℃で0.5倍のTBE緩衝液への2%標準EEOアガロース、および5V/cm、10分の予備実施)。

結果:

本発明による記載の混合物は、25サイクル後のリガーゼ連鎖反応 (92℃-20秒; 60℃-20秒; Stratagene LCRキット) と同じ結果を与えた。

実施例9: cDNAの逆転写、およびその後の等温増幅によるHIV-1 RNAの検出

非感染性RNAを、HIV-1 標準ベクターからin vitroで転写し、次いで希釈物として、特定のRNAの検出を特徴付けるのに用いた。cDNAへのRNAの逆転写の後、等温DNA増幅は、アガロースゲル電気泳動によって検出できるDNA断片を生じた。検出限界は、0.001アトモル未満である。

9. 1. in vitro転写によるRNAの生成

in vitro転写のための出発材料は、ベクターpBH10であって、約9 kbpのH I V I c D N AがSacI部位で組込まれている[Hahn et al., 1984, Nature 312:166]。このベクターを、標準的手法を用いて増幅し、精製し、BglIによる制限消化によって線状化した。S P 6というRNAポ

リメラーゼによる転写は、H I V配列の約50塩基上流にあり、下流の次のBglI部位まで延伸する特異的プロモーター領域でこうして線状化されたベクターに対して開始される。したがって、得られる転写体は、クローニングされた完全なウイルス配列に加えて、多重クローニング部位から上流の50塩基とともに残余ベクターから下流の1,470塩基を含む(pBH10はpSP64、Promega、米国の誘導体である)。こうして転写されたRNAの長さは、約10,200塩基であり、分子量は約3,060,000ダルトンである。

9. 2. 反応混合物

in vitro転写のために、ジエチルピロカルボネート(D E P C)による処理によって、すべての溶液およびプラスチック物品をRNAアーゼ活性から解放した。水またはそれぞれの水溶液への0.1体積%という濃度のD E P Cによって、室温で終夜反応させ、反応しなかったD E P Cは、121℃で120分間オートクレーブ処理することによって破壊した。

反応混合物100 μ lは、下記の組成を含む：

線状化したベクターpBH10/BglI 0.5 μ g

それぞれ1 mMのA T P、C T P、G T PおよびU T P (Boehringer Mannheim、ドイツ国)

40単位のR N A sin というRNAアーゼ阻害剤(Boehringer Mannheim、ドイツ国)

20単位のS P 6 RNAポリメラーゼ(Boehringer Mannheim、ドイツ国)

10倍に濃縮した反応緩衝液(Boehringer Mannheim、ドイツ国) 11 μ l

。

この混合物を37℃で14時間インキュベートした。次いで、50単

位のDNAse Iを加え、37℃で2時間インキュベートした。0.5MEDTA溶液(pH8.0)の添加によって、EDTAおよび濃度を20mMで水平化し、混合物を65℃に10分間加熱した。

続いて、3M酢酸ナトリウム0.1容およびエタノール2.5容による2回のエタノール沈澱を実施した。-20℃で30分以内の沈澱の形成の後、10,000×gで30分間遠心分離を実施し、ペレットを70体積%エタノール500μl中で洗浄した。第二の沈澱の後、25μlに減らした体積の水に再溶解した。転写体の濃度を光度測定によって決定した。本実施例に用いたRNAサンプルは、100倍の体積への希釈の後、260nmの波長で水に対して0.092の吸光係数を示した。したがって、希釈しなかった溶液中の一本鎖RNAの、0.4μg/μlの濃度を推定することができる。得られたサンプルは、5μlのアリコートとして、-20℃で2ヶ月間まで貯蔵した。

9.3. 等温増幅によるHIV-I 配列を有するRNAの検出

検出は、ウイルスRNAからのcDNA合成、およびその後のDNAの等温増幅を含む。本実施例では、オリゴヌクレオチドビルディングブロックHB101U699で逆転写を開始する。増幅は、このオリゴヌクレオチドビルディングブロックと、第二のオリゴヌクレオチドであるHB101L725との間で進行する。必要とされる装置は、0.5℃の精度で定常温度を有する加熱ブロック、または相当する水浴、ならびにアガロースゲル電気泳動のための標準的装置である。

9.4. 反応混合物

ウイルス配列を有する転写体を、希釈範囲が1μlあたり1フェムトモル～0.001アトモルとなるように、氷冷水で希釈した。希釈物は、その使用の直前に調製した。それぞれ1μlのRNA希釈物を、逆転写混合

物7μlを収容する0.5mlエッペンドルフ反応管中で形質転換した。サンプルとともに、逆転写のための8μlの体積は下記の組成を有した：

10mMのトリスHCl緩衝液(pH8.8)

50mMのKCl

4 mMのMgCl₂

0.6 w/v %のTriton X-100 (Sigma Chemicals、米国)

それぞれ0.5 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP (PROMEGA、米国)

8 pmolのオリゴヌクレオチドビルディングブロックHB101U699

60単位のRNAsin (Boehringer Mannheim、ドイツ国)

2単位のAMV逆転写酵素 (Boehringer Mannheim、ドイツ国)。

反応混合物を軽質鉱油 (Sigma Chemicals、米国) 50 μ lで覆い、サーモサイクラー (Trioblock TB1、Biometra、ドイツ国) で下記のプログラムに付した：

65℃で10分間、42℃に保つ。42℃で20分後、エッペンドルフ管をサーモサイクラー上に放置し、増幅混合物25 μ lを無作為に加えた。次いで、反応混合物を72℃で9時間インキュベートした。

増幅混合物：

20 mMのトリスHCl緩衝液、pH8.9

10 mMのKCl

10 mMの(NH₄)₂SO₄

4 mMのMgCl₂

0.1 w/v %のTriton X-100 (Sigma Chemicals、米国)

それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP

(Boehringer Mannheim、ドイツ国)

1 pmol/ μ lのオリゴヌクレオチドビルディングブロックHB101L725

0.8 pmol/ μ lのオリゴヌクレオチドビルディングブロックHB101U699

25 μ lあたり0.75単位のTaq DNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim、ドイツ国)

用いたオリゴヌクレオチドは、ABI392 DNA合成装置 (Applied Biosys

tems、米国)で、下記の配列を用いて合成した:

HB101U699 5'-dAgC CAT gCA AAT gTT AAA AgA gAC CA-3' および

HB101L725 5'-dCCC ATT CTg CAg CTT CTT CAT TgA-3'

増幅したDNA溶液を、電気泳動を用いて、標準的条件下で分析した。それぞれ20 μ lの反応混合物に、ローディング緩衝液4 μ lを加え、0.5倍のTBE緩衝液への2%アガロースゲル中で、5V/cmで分離した。ゲル上のDNAを、臭化エチジウム染色およびUV蛍光分析によって可視化した。

| | |
|----------------------|------------------------|
| 0.5 \times TBE 緩衝液 | ローディング緩衝液 |
| 45 mM トリス | 40 w/v % ショ糖 |
| 45 mM ホウ酸 | 0.05 w/v % ブロモフェノールブルー |
| 1 mM EDTA | |

その結果、図1は、列2~8での50塩基対長の単一带域の外見を示すが、それらは、HIV-I配列を有する1 fmol、100 amol、10 amol、1 amol、0.1 amol、0.01 amolおよび0.001 amolのRNAの希釈段階での1 fmol (列2)~0.001 amol (列8)のRNAの量に相当する。列1および10は、サイクル的な熱変性(「PCR」)によるDNA

増幅からの50および83塩基長の参照帯域を示す。希釈に用いた水1 μ lから作成した盲検対照は、列9および11にある。列12は、逆転写酵素である酵素なしの盲検増幅からの結果を示し、列13は、Taq DNAポリメラーゼを加えない盲検対照を示す。

実施例10: 固相での等温DNA増幅を用いたDNAの検出

一方は、プラスチック表面に固定化され、相補的な他方は、溶液中に遊離している2種類のオリゴヌクレオチドの間で、標的DNA断片を等温的に増幅する。検出のために、固定化生成物を、標識したプローブとハイブリダイズさせた。標識は、免疫学的手段によって検出する。

10.1. 固相でのDNAの等温増幅:

等温DNA増幅のために、オリゴヌクレオチドHB101725 bioを5'末端でビオチン化し、ストレプトアビジンで被覆したマイクロプレート(Xenopr

obe、Xenopore、米国) 上へと固定化し、50 pmolのオリゴヌクレオチドを1ウェルあたり100 μ lのPBSE-TW緩衝液に希釈し、1時間緩慢に攪拌した。PBSE-TW250 μ lでの8回の洗浄によって、結合しなかったオリゴヌクレオチドを除去した。

1×PBSE-TW、pH7.4は：

8 mMの Na_2HPO_4

2 mMの KH_2PO_4

137 mMの NaCl

3 mMの KCl

1.5 mMのEDTA

0.1 w/v %のTween 20 (Merck、ドイツ国)

を含有する。

洗浄したプレートを、1ウェルあたり200 μ lの1×増幅緩衝液を用

いて、72℃で30分間平衡させた：

1×増幅緩衝液：

20 mMのトリスHCl緩衝液、pH8.9

10 mMの KCl

10 mMの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2 mMの MgSO_4

0.1 w/v %のTriton X-100 (Sigma Chemicals、米国)。

増幅反応のために、この増幅緩衝液を1ウェルあたり100 μ lの増幅混合物で置き換え、検出しようとする断片を3種類の異なる希釈物に、それぞれ1 μ lの溶液として加えた。マイクロタイタプレートを振盪し、蒸発に対抗してプラスチックシール(Nunc、デンマーク国)で覆い、72℃で15時間インキュベートした：

増幅混合物：

それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP (Boehringer Mannheim、ドイツ国)

1 pmol/ μ l のオリゴヌクレオチドビルディングブロック HB101U699
 9
 100 μ l あたり 1.5 単位の Taq DNA ポリメラーゼ (Boehringer Mannheim、ドイツ国)
 を含有する 1×増幅緩衝液。

用いたオリゴヌクレオチドビルディングブロックは、ABI 392 DNA 合成装置 (Applied Biosystems、米国) で、下記の配列を用いて合成した：

HB101U699: 5'-dAgC CAT gCA AAT gTT AAA AgA gAC CA-3' ;

HB101L725bio: 5'-dCCC ATT CTg CAg CTT CTT CAT TgA-3' , 5' 末端でビオチン化；

検出オリゴ：5' 末端で 6-カルボキシフルオレセイン標識した、

5'-dgTT AAA AgA gAC CAT CAA TgA ggA Ag-3' ,

10. 2. 固相に固定化された増幅 DNA の検出

増幅後に、マイクロタイタプレートに PBSE、TW で 3 回洗浄し、ハイブリダイゼーションのために同じ緩衝系で予め条件を整えた：0.1 mg/ml の直前に変性させたニシン精子 DNA (Boehringer Mannheim、ドイツ国) を PBSE、TW に溶解し、1 ウェルあたり 200 μ l の条件調整液を 30 分間加え、500 rpm での攪拌下、50℃ でインキュベートした。ハイブリダイゼーションのために、1 ウェルあたり 100 μ l の条件調整液を 1 ウェルあたり 5 pmol の検出オリゴとともに用いた。上記の条件下で 30 分のハイブリダイゼーションの後、プレートを、50℃ での PBSE、TW 250 μ l で 10 分間の洗浄を 5 回実施した。

免疫学的検出のためには、1 ウェルあたり 250 μ l の、PBSE への 3% カシトーン (casitone) (Difco、米国) (遮断液) でプレートを遮断した。室温で 30 分の遮断の後、遮断液で 1:2000 に希釈した、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (DAKO、デンマーク国) に結合させた抗フルオレセインイソチオシアネート抗体とともに、ウェルをインキュベートした。

PBSE、TW で 5 回の洗浄の後、各ウェルに、ペルオキシダーゼ基質 (Immu

noPure、Pierce、米国) 110 μ lを加え、25分間インキュベートした。4規定硫酸110 μ lで酵素反応を停上した後、吸光度の差を450nmで測定した。

事前のDNA増幅なしのハイブリダイゼーション後の抗体結合体の消衰

を減じた後、下記の結果が得られた：

| 鋳型の出発量 | | 手順 | 消衰差 |
|--------|---------|----------------------------------|-------|
| 1 | 1fmol | 完全 | 0.446 |
| 2 | 100amol | 完全 | 0.318 |
| 3 | 10amol | 完全 | 0.112 |
| 4 | 0amol | 完全 | 0.081 |
| 5 | 1fmol | Taq DNAポリメラーゼなし | 0.076 |
| 6 | 1fmol | Taq DNAポリメラーゼなし、 HB101U699 なし | 0.048 |
| 7 | 0amol | 増幅反応なし | 0.000 |

10.3. データの解釈

鋳型の最初の量と相関させて、吸光度の差の増加を測定した(第1、2、3および4行を参照されたい)。本発明による方法は、固相上の少量の鋳型を等温的に増幅することができる。得られた値の意義を立証するため、追加の盲検対照を実施した。Taq DNAポリメラーゼの省略下での(第5行)、およびTaq DNAポリメラーゼなし、かつオリゴヌクレオチドHB101U699なしでの(第6行)不完全な盲検対照は、それぞれ、最大量の鋳型の使用(1fmol)に基づいており、鋳型なしの完全な反応の盲検対照(第4行)より低い。したがって、得られた結果(第1、2、3、4行)は、増幅およびハイブリダイゼーションからのヌクレオチド成分による干渉量と重なり合うことはない。

実施例11：部分的に重複するオリゴヌクレオチド対を用いる等温増幅によるDNAの検出

この実施例は、部分的に重複する本発明の等温DNA増幅の有用性を実証する。塩基配列が部分的に重複するオリゴヌクレオチドの組合せを使用して、オリゴヌクレオチドに相同性である標的DNAにおける領域の重複

により、両方のオリゴヌクレオチドの合計の長さよりも短い長さの断片を増幅した。

11. 1. オリゴヌクレオチドビルディングブロック

オリゴヌクレオチドをABI 392 DNAシンセサイザ(Applied Biosystems, USA)上で合成した。配列は以下のとおり：

HIVLAP1 5'-dAAT AgT AAg AAT gTA TA^g CCC TAC CA^g CAT-3' および

HIVLAP2 5'-dTTT Tgg TCC TTg TCT TAT gTC CA^g AAT-3'

増幅に際し、2個の3'末端塩基(下線)が重複する情報を形成するようなオリゴヌクレオチドどうしを選択した。増幅生成物は、オリゴヌクレオチドHIVLAP1が先頭にある鎖に配列を有していた。

5'-dAAT AgT AAg AAT gTA TA^g CCC TAC CA^g CAT TCT ggA CAT AAg ACA Agg ACC AAA A-3'

等温増幅に用いた鋳型は、これらのオリゴヌクレオチドを用いてHIV-1 cDNAからサイクル熱変性増幅(PCR)によって製造された二本鎖DNA断片であった。プラスミドpBH10(Hahn et al., 1984, Nature 312:166)がこの反応の鋳型として働いた。

この鋳型の希釈物1 μ lを増幅配合物(以下参照)33 μ lと混合し、軽質鉱油(Sigma Chemicals, USA)50 μ lでオーバーレイし、70℃で15時間インキュベートした。

増幅混合物

20mMトリス-HCl緩衝剤、pH8.9

10mMKCl

10mM (NH₄)₂SO₄

2mM MgSO₄

0.1%(w/v)Triton X-100 (Sigma Chemicals, USA)

dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP (Boehringer Mannheim, Germany) 各0.2mM

0.2pmol/ μ lオリゴヌクレオチドビルディングブロックHIVLAP1

0. 2 pmol/ μ l オリゴヌクレオチドビルディングブロック HIV LAP 2
 33 μ l あたり 0. 5 単位 Taq DNA ポリメラーゼ (Boehringer Mannheim
 , Germany)

増幅した DNA 溶液を標準条件下で電気泳動によって分析した。反応混合物各
 20 μ l を試料緩衝剤 4 μ l で処理し、0. 5 倍 TBE 緩衝液中、2 % アガロー
 スゲル中 5 V/cm で分離した。臭化エチジウム染色および UV 蛍光分析によって
 DNA をゲル上で可視化した。

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| 0. 5 \times TBE 緩衝剤 | 試料緩衝液 |
| 45 mM トリス | 40 % (w/v) ショ糖 |
| 45 mM ホウ酸 | 0. 05 % (w/v) プロモフェノールブルー |
| 1 mM EDTA | |

電気泳動は、10 fmol の鋳型量で、増幅した DNA の強いバンドを示し、1 fmol の鋳型量で、十分に検出可能な生成物のバンドを示したが、水を盲対照として使用した場合、バンドをまったく示さなかった。長さ 50 塩基の標準に比較して僅かに遅い泳動速度により、形成された生成物の正しい長さ (55 塩基) を推定した。

実施例 12：逆転写ののち、修飾オリゴヌクレオチドを用いる cDNA の等温増幅による HIV-1 RNA の検出

非感染性 RNA を HIV 1 標準ベクターからインビトロ転写し、特定の RNA 検出系の特性決定に使用した。RNA を cDNA に逆転写したの

ち、等温 DNA 増幅によってビオチン化 DNA 断片を得た。形成した断片をストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタプレートに結合させ、蛍光標識プローブとでハイブリダイズし、抗フルオレセイン抗体酵素結合体によって検出した。RNA の検出限界は 0. 1 amol 未満であった。

12. 1. インビトロ転写による RNA の製造

この工程は実施例 9 の 9. 1 および 9. 2 に記載されているが、この実施例でも変更せずに使用した。

12. 2. HIV 1 配列を含む RNA からの核酸の等温増幅

この工程は実施例9の9. 3および9. 4に記載されているが、二つの変更を加えて使用した。

12. 2. 1. 等温増幅に使用する第二のオリゴヌクレオチドビルディングブロックを5'末端でビオチン化した。BH101L725bio

12. 2. 2. ウイルス配列を有する転写生成物の二つの希釈物を製造し、実験に使用した。10amol/ μ lおよび0.1amol/ μ l

使用するオリゴヌクレオチドビルディングブロックをABI392DNAシンセサイザ (Applied Biosystems, USA) 上で合成した。配列は以下のとおり：

HB101U699:5'-dAgC CAT gCA AAT gTT AAA AgA gAC CA-3' および

HB101L725Bio:5'-dCCC ATT CTg CAg CTT CTT CAT TgA-3' ,

5'末端でビオチン化

検出プローブ：

5' -d g T T A A A A g A g A C C A T C A A T g A g g A A g -3' , 5'末端の6-カルボキシーフルオレセイン-標識 (6-FAM Amidite を用いる合成、Applied Biosystems, USA)

12. 3. 固相における増幅DNAの検出

ビオチン化DNA生成物の結合のため、ストレプトアビジンを添加したマイクロタイタプレート (Xenoprobe, Xenopore, USA) をPBSE. TWで2回洗浄した。増幅したDNA溶液を9容量部のPBSE. TW緩衝液で希釈し、PBSE. TW100 μ l中この溶液1 μ lを5分間煮沸することによって変性した。マイクロタイタプレートの各ウェルに、変性溶液の全100 μ lをピペットで移し、50rpmで30分間振とうした。プレートをPBSE. TWで2回洗浄し、検出オリゴとでハイブリダイズさせた。

その後、ハイブリダイゼーションおよび抗体反応によってDNA断片を検出する方法の以下の工程は、実施例10の10. 2に記載されているが、以下の三つの方法で変更して使用した。

12. 3. 1. 検出プローブの濃度をウェルあたり2.5pmolにした。

12. 3. 2. 西洋ワサビペルオキシダーゼに結合した抗フルオレセインイソチ

オシアネート抗体の希釈を1：5，000にした。

12.3.3. ペルオキシダーゼ基質における発色のインキュベーション期間を80分にした。

12.4. データの解釈

鋳型の出発量に相関して増大する消衰差を計測した。記載する方法は、ビオチン化によって修飾されたオリゴヌクレオチドビルディングブロックを生成物に組み込みながら、少量の核酸を等温増幅するのに使用することができる。増幅したDNAは、修飾されたオリゴヌクレオチドビルディングブロックが必要であるいかなる検出方法によっても検出しやすい。

この実施例では、増幅したDNAをビオチン基によって固相に結合し、ハイブリダイゼーションによって定量した。

| 使用した鋳型の量 | | 増幅手法 | 消衰差 |
|----------|-----------|-----------------|-------|
| 1 | 10amol | 完全 | 1.516 |
| 2 | 0.1amol | 完全 | 0.376 |
| 3 | 0amol | 完全 | 0.180 |
| 4 | 0amol | Taq DNAポリメラーゼなし | 0.105 |
| 5 | 盲対照、結合体あり | | 0.087 |
| 6 | 盲対照、結合体なし | | 0.012 |

盲対照は、以下のように説明することができる。

ライン3は、RNA鋳型だけが除かれた最も完成したブランクを表す。ライン4はライン3に対応し、さらにTaq DNAポリメラーゼを除くが、ライン1、2および3の値に対し、10倍の量の増幅反応が使用された。ライン5および6は、抗体-ペルオキシダーゼ結合体ありのハイブリダイゼーションおよび抗体-ペルオキシダーゼ結合体なしのハイブリダイゼーションの検出からの盲対照を特徴付ける。

実施例13：修飾されたオリゴヌクレオチドを用いる等温増幅による配列特異的DNA検出

ビオチン化オリゴヌクレオチドを使用して標的DNAを等温増幅し、形成した

断片を、ハイブリダイゼーションにより、オリゴヌクレオチドを添加したマイクロタイタプレート上に捕捉した。修飾されたオリゴヌクレオチドビルディングブロックに結合するストレプトアビジン-酵素結合体を用いて、増幅したDNAの検出を実施した。

13. 1. 修飾されたオリゴヌクレオチドを用いるDNAの等温増幅

等温増幅の鋳型は、熱変性増幅（PCR）により、ヒトDNAからオリゴヌクレオチドビルディングブロック App130 および Appr30 によって製造しておいたDNA断片であった。20、2 および 0.2 fmol/ μ l の鋳型希釈物を製造し、各 1 μ l を増幅配合物 50 μ l に添加

した。配合物を鉱油（Sigma Chemicals, USA）50 μ l でオーバーレイし、サーモサイクラ（TB1, Biometra, Germany）中、77℃で90分間インキュベートした。

増幅混合物

20 mM トリス-HCl 緩衝液、pH 8.8

2 mM MgSO₄

0.1 % (w/v) Triton X-100 (Sigma Chemicals, USA)

dATP、dCTP、dGTP および dTTP (Promega, USA) 各 0.2 mM

0.2 pmol/ μ l オリゴヌクレオチドビルディングブロック App130 bio

0.2 pmol/ μ l オリゴヌクレオチドビルディングブロック Appr30

Deep Vent_R (ex) DNA ポリメラーゼ (NEB, USA) 50 μ l あたり 2 単位
使用するオリゴヌクレオチド構成単位を ABI 392 DNA シンセサイザ (Applied Biosystems, USA) 上で製造した。配列は以下のとおり。

Appl30Bio: 5'-dAgg TAG gTA AAC TTg ACT gCA TgT TTC CAA-3';

5' 末端でビオチン化、

Appl30: 5'-dAgg TAG gTA AAC TTg ACT gCA TgT TTC CAA-3',

Appr30: 5'-dgCC TAA TTC TCT CAT AgT CTT AAT TCC CAC-3', および

AppCap: 5' 末端で化学的にリン酸化した、

5'-dgTC TTA ATT CCC ACT Tgg AAA CAT gCA-3',

13. 2. 固相における増幅DNAの検出

増幅したDNAをハイブリダイゼーションによってマイクロタイタプレートの表面で捕捉した。このために、捕捉したオリゴヌクレオチド

(AppCap、上記参照)のプレートに対する化学カップリングを実施した。

カップリング手順

第二級アミノ基を有するマイクロタイタプレート (CovaLink NH, Nunc, Denmark) に、イミダゾール緩衝液 (0.1 M N-メチルイミダゾール、pH 7.0) 50 μ l 中、ウェルあたり 5 pmol のオリゴヌクレオチドビルディングブロック AppCap を添加した。イミダゾール緩衝液中 2 % (w/v) 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド溶液 50 μ l の添加によってカップリングを開始し、室温で3時間振とうした。その後、0.4 N NaOH および 0.25 % (w/v) ドデシル硫酸ナトリウムで6回洗浄し、PBSE-TW 緩衝剤で6回洗浄したのち、蒸留水で3回洗浄することにより、プレートを浄化した。

1 \times PBSE-TW、pH 7.4 は、以下を含有するものであった。

8 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂HPO₄

137 mM NaCl

3 mM KCl

1.5 mM EDTA

0.1 % (w/v) Tween 20 (Merck, Germany)

検出反応：変性したばかりのニシン精子DNAをPBSE-TWに溶解し(0.1 mg/ml)、ウェルあたりこの溶液 170 μ l を、50℃、500 rpm で15分間振とうしながらインキュベートすることにより、ハイブリダイゼーションに備えてプレートを事前に状態調節した。

ハイブリダイゼーションのために、増幅したDNA溶液を、5分間煮沸することによって変性した。ウェル1個に対し、新しい状態調節溶液

100 μ l 中に変性溶液 1 μ l を使用した。50℃、500rpm で振とうしながら120分間のハイブリダイゼーションののち、プレートを、50℃で10分間、PBSE. TW200 μ l で3回洗浄した。

等温増幅の生成物のこうして固定されたビオチン化鎖の検出のため、プレートを、室温で10分間、PBSE. TW中1.5%のカシトン (Difco, USA) ウェルあたり150 μ l で遮断し、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ結合体 (Amersham, UK) で30分間インキュベートした (遮断溶液中1:2000)。

プレートをPBSE. TWで6回洗浄し、染色溶液100 μ l 中で90分間発色させた。405nmでの消衰差を光度測定的に測定した。

染色溶液

50mM トリス. NaOH、pH10

150mM NaCl

2mM MgSO₄

7mM 4-ニトロフェニルホスフェート

結果

| 鋳型の出発量 | | 増幅手法 | 消衰差 |
|--------|---------|---|-------|
| 1 | 20fmol | 完全 | 0.573 |
| 2 | 2fmol | 完全 | 0.232 |
| 3 | 0.2fmol | 完全 | 0.055 |
| 4 | 0fmol | Deep Vent _R (ex ⁻) Pol. なし | 0.030 |
| 5 | 0fmol | ハイブリダイゼーション盲対照 結合体あり | 0.019 |

13.3. データ解釈

鋳型の量に相関して増大する消衰差を計測した (ライン1、2、3)。本明細書に記載する本発明の方法は、ビオチン化によって修飾されたオリゴ

ヌクレオチドビルディングブロックが生成物に組込まれる少量の核酸の等温増幅を実施することができる。したがって、増幅したDNAは、修飾されたオリゴ

ヌクレオチドビルディングブロックを要するいかなる検出反応にも利用することができる。この実施例では、ストレプトアビジンと結合したマーカ酵素（アルカリホスファターゼ）が、増幅したDNAのビオチン化に結合する。増幅したDNAの検出の特異性は、盲対照4および5によって保証された。これらの対照においては、鋳型なし、かつDeep Vent_R (exe) DNAポリメラーゼなしの盲増幅（ライン4）および増幅配合物を添加しない盲ハイブリダイゼーション（ライン5）が、最低計測値よりも有意に低い消衰差を示した（ライン3）。

実施例14：1時間以内の本発明の方法の増幅速度

この実施例は、短い反応時間内で可能である高い増幅速度を示す。

2種の独立したオリゴヌクレオチド／鋳型の組合せを使用した。

組合せ1：

オリゴヌクレオチドビルディングブロック

"APPR30":5'-dAgg TAg gTA AAC TTg ACT gCA TgT TTC CAA-3'

"APPL30":5'-dgCC TAA TTC TCT CAT AgT CTT AAT TCC CAC-3'

および、以下の配列

5'-dAgg TAg gTA AAC TTg ACT gCA TgT TTC CAA gTg ggA ATT AAg ACT ATg
AgA gAA TTA ggC-3'

を有する鋳型「APP」（合成二本鎖DNA）片を使用した。

組合せ2：

オリゴヌクレオチドビルディングブロック

"synth1":5'-dTAG gTT ACT TAg CAT TCT CCA CTT AgA CgA-3'

"synth2":5'-dCTA gAg ATA TTg TTC CAT ACA gAT CCC AgT-3'

および、以下の配列

5'-dTAG gTT ACT TAg CAT TCT CCA CTT AgA CgA ACT ggg ATC TgT ATg gAA
CAA TAT CTC TAG-3'

を有する鋳型「Synth」（合成二本鎖DNA）片を使用した。

反応配合物（50 μ l）

20mMトリス-HCl、pH8.8

5 mM MgSO₄

dNTP、各 100 μM

0.1 % (w/v) Triton X-100

オリゴヌクレオチドビルディングブロック、各 0.2 μM

それぞれのビルディングブロックに適合する鋳型：

種々の配合物に異なる量、200 amol、20 amol、2 amolの鋳型を加えた。

鋳型DNAを加えなかった反応配合物は盲対照として働いた。

14. 1. 反応

反応配合物を 77 °C に加熱し、鉱油／軽質でオーバーレイし、反応あたり 2 単位の Deep Vent_R (exe) DNA ポリメラーゼ (NEB, USA) の添加によって反応を開始した。

77 °C で 1 時間後、数分のうちに反応管を室温に冷却し、その 10 μl をゲル電気泳動で分析した (0.5 倍トリス-ボレート-EDTA (TBE) 緩衝液中 % 標準 EEO-アガロース、4 °C および 5 V/cm、予備泳動 10 分間)。適合する鋳型を加えたすべての試料反応配合物は 60 bp で有意なバンドを示した。負の対照はバンドを示さなかった。

実施例 15：種々の長さの直鎖状二本鎖 DNA の増幅

この実施例は、特定のオリゴヌクレオチド対を用いて、異なる長さの鋳

型配列を増幅する可能性を示す。

反応配合物：

反応配合物 50 μl を 0.5 ml 反応管 (Eppendorf, Safe-Lock) にピペットで移した。反応配合物は以下の組成を示した。

20 mM Tris-HCl (pH 8.8, 25 °C)

2 mM MgSO₄

各々 250 μM TTP, d GTP, d ATP, d CTP

0.1 % (M/V) Triton X-100

10 pmol オリゴヌクレオチドビルディングブロック u676:

5' -dgAgCCTTCAACCCAgTCAgCTCCTTCCggTgggCgCggggC-3'

10pmol オリゴヌクレオチドビルディングブロック1755

5'-dCgCCgAAAATgACCCAgAgCgCTgCCggCACCTgTCCTACgAgTTgCATg-3'

20fmol 鋳型-DNA

種々の配合物における鋳型DNAとして、以下の二本鎖合成DNAを使用した：
「iso2」、「iso2+1」、「iso2+5」（配列は付録を参照）

負の対照は、鋳型DNAなしの反応配合物であった。

そして、反応配合物を鋳油（Sigma M-3516）100 μ lでオーバーレイし、Perkin Elmer Cetus Gene Amp PCR System 9600 サーマスタット上で84℃に加熱した。反応温度に達したのち、酵素Deep Vent_R（exe）DNAポリメラーゼ（New England Biolabs）2単位を配合物に加えた。試料および盲対照を84℃で14時間さらにインキュベートした。

結果の可視化

配合物を標準条件下で電気泳動によって分析した。反応配合物20 μ lを試料緩衝液4 μ lで処理し、0.5倍TBE緩衝液中2%アガロースゲル中5V/cmで分離した。ゲル上のDNAを臭化エチジウム染色およびUV蛍光分析によって可視化した。

0.5×TBE緩衝液（45mMトリス、45mMホウ酸、1mMEDTA）

試料緩衝液：40%（w/v）ショ糖、0.05%（w/v）ブロモフェノールブルー

結果

電気泳動は、生成物に対応する高さで、鋳型「iso2」を有する試料の場合に有意なバンドを示し、鋳型「iso2+1」を有する試料の場合に弱いバンドを示し、鋳型「iso2+5」を有する試料の場合に非常に弱いバンドを示した（形成された生成物の正しい長さは、標準DNAである米国Biochemicals, Ohio, USAの50塩基対のはしごに比較することによって推定した）。鋳型なしの反応配合物はバンドを示さなかった。

実施例16：修飾されたオリゴヌクレオチドビルディングブロックを用いる等温増幅によるHIV-1配列の検出

この実施例は、標識されたオリゴヌクレオチドビルディングブロックの使用に

よる、特異性配列の増幅を示す。増幅生成物が2種の異なる標識を担持するように、両方の特異性オリゴヌクレオチドビルディングブロックが異なる標識を担持した。一つの標識（ビオチン）は、第二の標識（蛍光）によってさらなる検出を受けやすいよう、産物を固相に固定するためにだけに使用した。特異性標的分子の一連の希釈物により、一定範囲の産物の量が鋳型の初期量に比例することが示された。

使用するオリゴヌクレオチドをABI 392 DNA シンセサイザ (Applied Biosystems, USA) 上で調製した。配列は以下のとおり：

HB101U699FAM: フルオレセイン-5'-dAgC CAT gCA AAT gTT AAA AgA gAC CA-3'
'および

HB101L725Bio: ビオチン-5'-dCCC ATT CTg CAg CTT CTT CAT TgA-3'

使用された鋳型は、以下の配列を有する合成二本鎖DNAであった：

5'-dAgCCATgCAAATgTTAAAAgAgACCATCAATgAAgAAgCTgCAgAATggg-3'

反応配合物

反応配合物 50 μ l を 0.5 ml 反応管 (Eppendorf, Safe-Lock) にピペットで移した。反応配合物は以下の組成を有するものであった。

20 mM トリス-HCl (25 $^{\circ}$ C で pH 8.8)

5 mM MgSO₄

TTP、dGTP、dATP および dCTP、各 200 μ M

0.1 % (w/v) Triton X-100

10 pmol オリゴヌクレオチドビルディングブロック HB101U699FAM

10 pmol オリゴヌクレオチドビルディングブロック HB101L725bio

鋳型DNA

負の対照のため、上記と同じ、ただし鋳型DNAを除いた反応配合物をピペットで移した。

そして、反応配合物を鉱油 (Sigma M-3516) 100 μ l でオーバーレイし、サーモスタット (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus)

上で 74 $^{\circ}$ C に加熱した。そして、酵素 Deep Vent_R (exo) DNA ポリメラーゼ (N

ew England Biolabs) 2単位を加え、90分間インキュベートした。

各反応配合物10 μ lを2%アガロースゲル中で分離し、臭化エチジウム染色およびUV蛍光分析によって可視化した。DNA長さ基準との比較により、増幅生成物を単一バンドとして同定することができた。

マイクロタイタプレートにおける固相検定による検出

ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロタイタプレート (Xenoprobe, Xenopore, USA) をPBSで洗浄した。次に、TPBS中に1:10、1:40および1:4,000に希釈しておいた増幅反応の

単一試料100 μ lをウェルにピペットで移し、室温で25分間振とうした。続いて、プレートをTPBSで3回洗浄した。希釈結合体 (抗フルオレセイン-アルカリホスファターゼ、Boehringer Mannheim, Germany、TBS中1:10、000) 100 μ lを各ウェルに加えた。定速で攪拌しながら室温で1時間インキュベートしたのち、プレートを再びTPBSで3回洗浄した。さらに1回PBSで洗浄したのち、染色溶液(LumiPhos plus, Lumigen, USA) 100 μ lを各ウェルに加えた。

30分間インキュベートしたのち、ルミノメータ(Lucy 1, Anthos, Austria)を用いて発光を計測した。負の対照からノイズを計測した。

結果

| 分子の数 反応中 | 希釈 | 信号/雑音 | |
|-------------------|-----|-------|------|
| | | 1:40 | 1:10 |
| 1 | 1 | 2 | 10 |
| 72 | 1 | 7 | 30 |
| 7.2×10^3 | 5 | 150 | |
| 7.2×10^5 | 40 | 1013 | |
| 7.2×10^7 | 71 | | |
| 7.2×10^9 | 111 | | |

実施例17：プライマーを用いる切断されていないプラスミドからの切片の増幅、増幅生成物は、2個のオリゴヌクレオチドビルディングブロックの塩基の合計よりも長い

直鎖状になっていないプラスミド pUC19 が鋳型 DNA として働いた。以下のオリゴヌクレオチド構成単位を使用した。

pUC19:20U1897(5'-dAgTAgTTCgCCAgTTAATAg-3')および

pUC19:18L1926(5'-dgTAgCAATggCAACAACg-3')

反応配合物 50 μ l を 0.5 ml 反応管 (Eppendorf, Safe-Lock) にピ

ペットで移した。反応配合物は以下の組成を有するものであった。

20 mM トリス-HCl (25 °C で pH 8.8)

5 mM MgSO₄

TTP、dGTP、dATP および dCTP、各 200 μ M

0.1 % (w/v) Triton X-100

10 pmol オリゴヌクレオチドビルディングブロック pUC19:20U1897

10 pmol オリゴヌクレオチドビルディングブロック pUC19:18L1926

1 ng 鋳型 DNA

負の対照として、上記と同じ、ただし鋳型 DNA を除いたことが異なる反応配合物をピペットで移した。そして、反応配合物を鉱油 (Sigma M-3516) 100 μ l でオーバレイした。配合物をサーモスタット (Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus) 上で 74 °C に加熱したのち、酵素 Deep Vent[®] (ex) DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs) 2 単位を加え、1 時間インキュベートした。

反応配合物 10 μ l を 2 % アガロースゲル上で分離し、臭化エチジウム染色および UV 蛍光分析ののち可視化した。DNA 長さ基準との比較により、増幅生成物を単一バンドとして同定することができた。

付録

iso2:

5'-dgAgCCTTCAACCCAgTCAgCTCCTTCCggTgggCgCggggCCATgCAACTCgTAggACAggTgC

CggCAGCgCTCTgggTCATTTTCggCg-3'

3' -dCTCggAAgTTgggTCAGTCgAggAAggCCACCCgCgCCCCggTACgTTgAgCATCCTgTCCACg
gCCgTCgCgAgACCCAgTAAAAgCCgC-5'

iso2+1:

5' -dgAgCCTTCAACCCAgTCAGCTCCTTCCggTgggCgCggggCACATgCAACTCgTaggACAggTg
CCggCAGCgCTCTgggTCATTTTCggCg-3'

3' -dCTCggAAgTTgggTCAGTCgAggAAggCCACCCgCgCCCCgTgTACgTTgAgCATCCTgTCCAC
ggCCgTCgCgAgACCCAgTAAAAgCCgC-5'

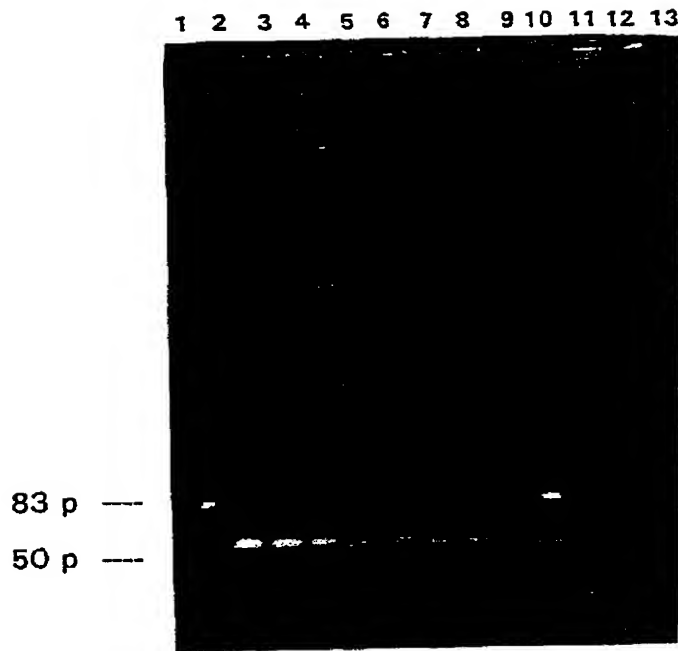
iso2+5:

5' -dgAgCCTTCAACCCAgTCAGCTCCTTCCggTgggCgCggggCAAAAAATgCAACTCgTaggACA
ggTgCCggCAGCgCTCTgggTCATTTTCggCg-3'

3' -dCTCggAAgTTgggTCAGTCgAggAAggCCACCCgCgCCCCgTTTTTgTACgTTgAgCATCCTgT
CCACggCCgTCgCgAgACCCAgTAAAAgCCgC-5'

【図 1】

図 1



図：HIV I 配列を有するRNAを逆転写したのち、等温増幅するによって得られたDNA断片のアガロース電気泳動図

レーン1および10：50および83塩基長の基準断片

レーン2、3、4、5、6、7、8：HIV I 配列を有するRNA

1 fmol、100 amol、10 amol、1 amol、0.1 amol、0.01 amolおよび0.001 amolの検出

レーン9および11：RNAなしの水の盲対照

レーン12：逆転写酵素なしの等温増幅の盲対照

レーン13：逆転写酵素なし、かつTaq DNAポリメラーゼなしでの盲対照

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1997年8月11日

【補正内容】

3. 増幅に使用されるポリメラーゼが逆転写酵素活性をも示す、請求項2記載の方法。

4. ポリメラーゼに加え、リガーゼを酵素として増幅に使用する、請求項2または3記載の方法。

5. 増幅に使用される酵素がリガーゼである、請求項1記載の方法。

6. 使用されるオリゴヌクレオチドの少なくとも1個を、適当な担体、例えばプラスチック面に固定する、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

7. 使用されるオリゴヌクレオチドの鎖解開始温度よりも高い温度で増幅を実施する、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

8. オリゴヌクレオチドをできるだけ鑄型に近づける、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。

9. ヘルパーオリゴヌクレオチドを増幅の改善に使用する、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

10. オリゴヌクレオチド配列が鑄型配列の少なくとも一部に正確に相補的である、請求項1～9のいずれか1項記載の方法。

11. 人間または動物の体の外での診断方法に用いるための、請求項1～10のいずれか1項記載の方法の用途。

12. オリゴヌクレオチドと目的産物との間の鎖解開始温度の差が25℃を超えず、好ましくは20℃を超えず、特に好ましくは15℃を超えない、請求項1～10のいずれか1項記載の方法に使用するための、オリゴヌクレオチドを含有する試薬キット。

13. オリゴヌクレオチドと目的産物との間の鎖解開始温度の差が10℃を超えず、好ましくは5℃を超えない、請求項12記載の試薬キット。

14. 核酸の様々な増幅方法における増幅工程としての請求項1～10のいずれか1項記載の方法の用途。

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1997年8月28日

【補正内容】

請求の範囲

1. 核酸または核酸配列を、場合によっては、増幅の前に少なくとも部分的に1本ずつの鎖に分け、および／または転写し、反応配合物が、増幅させる核酸または核酸配列の末端の塩基配列に対して実質的に相補的である塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを含み、前記オリゴヌクレオチドが、適当な条件下、核酸合成のための出発点および／または化学ビルディングブロックを形成してもよく、形成させる増幅生成物に組込まれ、これらのビルディングブロックからの生成物そのものが核酸または核酸配列に対応する、酵素による核酸または核酸配列の指数関数的な無転写増幅方法において、

オリゴヌクレオチドビルディングブロック、場合によっては鋳型および場合によってはさらなる化学ビルディングブロックによって構成された反応生成物が、オリゴヌクレオチドビルディングブロックと再び一工程で反応し、

反応が、反応生成物の二本鎖形態を不安定化する温度で実施され、前記温度が実質的に等温に維持され、

ポリメラーゼを酵素として使用するとき、ポリメラーゼが鎖置換活性を示すことを特徴とする方法。

2. 増幅に使用される酵素がポリメラーゼである、請求項1記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12Q1/68 | | Int. Application No. PCT/AT 96/00106 |
|---|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 94 03635 A (INST OF MOLECULAR BIOLOGY & BI) 17 February 1994 see the whole document --- | 1-15 |
| Y | CRITICAL REVIEWS IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 26, no. 3/4, 1991, pages 227-259, XP000616490 WETMUR: "DNA probes: application of the principles of nucleic acid hybridization" see D.1. D-loops and R-loops, s.243, first paragraph. see the whole document --- | 1-15 |
| Y | US 5 273 881 A (SENA ELISSA P ET AL) 28 December 1993 see column 18, lines 34-41. see the whole document --- | 1-15 |
| -/- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. | | <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel, or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 6 February 1997 | | Date of mailing of the international search report 0 7. 03. 97 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5812 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Hagenmaier, S |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 96/00106

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | EP 0 497 272 A (BECTON DICKINSON CO) 5 August 1992 see the whole document --- | 1-15 |
| A | WO 90 01069 A (SEGEV DIAGNOSTICS INC) 8 February 1990 cited in the application see the whole document --- | 1-15 |
| A | J.BIOL.CHEM., vol. 269, no. 13, 1 April 1994, pages 10163-10168, XP002024694 KMEIC AND HOLLOMAN: "DNA strand exchange in the absence of homologous pairing" see the whole document --- | 1-15 |
| A | BIOCONJUGATE CHEM., vol. 6, February 1995, pages 93-100, XP002024695 COREY ET AL.: "Strand invasion by oligonucleotide-nuclease conjugates" see the whole document --- | 1-15 |
| P,X | WO 95 25180 A (GEN PROBE INC) 21 September 1995 see the whole document --- | 1-15 |
| P,Y | JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 24, 16 June 1995, pages 14712-14717, XP000601663 IYER M ET AL: "ACCELERATED HYBRIDIZATION OF OLIGONUCLEOTIDES TO DUPLEX DNA" cited in the application see the whole document ----- | 1-15 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 96/00106

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9403635 | 17-02-94 | NONE | |
| US-A-5273881 | 28-12-93 | US-A- 5223414 | 29-06-93 |
| | | AU-B- 661505 | 27-07-95 |
| | | AU-A- 2540192 | 05-04-93 |
| | | CA-A- 2116215 | 05-03-93 |
| | | EP-A- 0612352 | 31-08-94 |
| | | FI-A- 941016 | 03-05-94 |
| | | WO-A- 9305178 | 18-03-93 |
| | | JP-T- 6510201 | 17-11-94 |
| | | NO-A- 940744 | 02-05-94 |
| | | CA-A- 2056983 | 08-11-91 |
| | | DE-D- 69122712 | 21-11-96 |
| | | EP-A- 0481065 | 22-04-92 |
| | | JP-T- 4507198 | 17-12-92 |
| | | WO-A- 9117267 | 14-11-91 |
| EP-A-0497272 | 05-08-92 | US-A- 5455166 | 03-10-95 |
| | | AT-T- 128737 | 15-10-95 |
| | | AU-B- 652214 | 18-08-94 |
| | | AU-A- 1026492 | 06-08-92 |
| | | AU-B- 659429 | 18-05-95 |
| | | CA-A- 2060371 | 01-08-92 |
| | | CA-A- 2060372 | 01-08-92 |
| | | DE-D- 69205181 | 09-11-95 |
| | | DE-T- 69205181 | 21-03-96 |
| | | ES-T- 2077887 | 01-12-95 |
| | | JP-A- 5192195 | 03-08-93 |
| | | JP-B- 7114718 | 13-12-95 |
| | | AU-A- 1069992 | 29-07-93 |
| | | BR-A- 9300028 | 28-09-93 |
| | | KR-B- 9503619 | 17-04-95 |
| WO-A-9001069 | 08-02-90 | AT-T- 138106 | 15-06-96 |
| | | DE-D- 68926504 | 20-06-96 |
| | | DE-T- 68926504 | 12-09-96 |
| | | EP-A- 0425563 | 08-05-91 |
| | | JP-T- 3505971 | 26-12-91 |
| WO-A-9525180 | 21-09-95 | AU-A- 2101695 | 03-10-95 |

Information on patent family members

PCT/AT 96/00106

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9525180 | | EP-A- 0676476 | 11-10-95 |
| ----- | | | |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN